

PARAMETROS INMUNOLOGICOS HUMORALES Y CELULARES EN PRIMATES NO HUMANOS *CEBUS APELLA* CON INFECCION CHAGASICA CRONICA

**Kumiko Eiguchi de Palmero,
Daniel Rodolfo Grana,
Emilio Malchiodi,
Elena Gómez,
Washington Sesma
y Ricardo Margni.**

Introducción

La enfermedad de Chagas, zoonosis producida por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, es un grave problema de Salud Pública que afecta a un gran número de personas en Latinoamérica. La Organización Mundial de la Salud, en un informe publicado en 1991, considera que 90 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección en Centro y Sudamérica, y se calcula que 24/25 millones están parasitados por el *T. cruzi* (1). Teniendo en cuenta que el 25% desarrollará algún tipo de trastornos cardíacos, serían 6,2 millones los afectados del corazón con la consecuente posibilidad de muerte o invalidez (2). En los Estados Unidos la seropositividad se calcula en 350.000 casos, con aproximadamente 100.000 chagásicos crónicos (3).

Sin embargo, la patogenia de la enfermedad de Chagas en su etapa crónica carece de una clara explicación, ya que su lento desarrollo en el humano dificulta el estudio longitudinal de los mecanismos intervinientes. Esta es una de las razones más importantes para encontrar un modelo experimental del Chagas crónico. Tomando como base trabajos en distintos modelos experimentales y en estudios anatomopatológicos en pacientes fallecidos por la enfermedad, se han propuesto diferentes teorías que expliquen los mecanismos patogénicos (4):

- Lesión directa por parasitismo de las células por el *T. cruzi* (mecánica).
- Lesión provocada por la acción de toxinas liberadas por el parásito o por la interacción de éste con la célula huésped.
- Alteraciones del sistema nervioso autónomo (neurogénica).
- Lesión inducida por la respuesta autoinmune del huésped (inmunogénica).
- Lesión microvascular (hipoxémica).
- Mecanismos combinados (mixta).

El primate no humano del Nuevo Mundo *Cebus apella* es un modelo experimental apropiado de la enfermedad de Chagas latente y crónica, dado que reproduce las

Actividad Natural Killer (NK)

Se realizó un ensayo de citotoxicidad por liberación de ^{51}Cr , por triplicado, usando la línea celular K-562 de eritroleucemia humana como blanco. Se separaron los linfocitos por gradiente de Ficoll Hypaque y se obtuvieron células no adherentes, incubándolas en placas de Petri durante 45 minutos a 37°C , 5% de CO_2 y 100% de humedad para ser usadas como células efectoras (E). Resumiendo se marcaron 1×10^6 células blanco (B) con 100 mCi de Na^{51}CrO durante 1 hora, se lavaron e incubaron por otra hora para minimizar la liberación espontánea, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio RPMI-1640 a una concentración de 1×10^5 células / ml. Se agregó un número creciente de células efectoras, suspendidas en 100 μl de medio, a iguales volúmenes de células blanco. La proporción de células E / B fue de 12,5:1 a 50:1. Después de 4 horas de incubación a 37°C , 5% de CO_2 , 100% de humedad, se centrifugaron para extraer 100 μl de sobrenadante para el conteo en un contador Beckman Gamma 5000. Se determinó la liberación basal incubando las células blanco en medio RPMI, y la liberación máxima se obtuvo tratando con detergente las células blanco. El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Test cpm} - \text{cpm espontáneo}}{\text{cpm totales} - \text{cpm espontáneos}} \times 100$$

Resultados

Los resultados de la cuantificación de inmunoglobulinas se observan en las tablas 1 y 2; sólo las IgG mostraron una diferencia significativa entre los grupos ($309,3 \pm 96,3$ UI/dl en los infectados vs. $242,0 \pm 32,9$ UI/dl en los controles, $p < 0.01$).

La cuantificación de células T y B se observa en la tabla 3, donde los monos infectados poseen menor cantidad de linfocitos T que los controles ($53,1 \pm 8,7$ % vs. $70,2 \pm 10,4$ %; $p < 0.01$).

La actividad citotóxica natural (NK) se muestra en la tabla 4, donde con una proporción efector/blanco = 50:1, en los infectados se observó una menor actividad ($17,6 \pm 9,6$ % vs. $38,8 \pm 7,2$ %; $p < 0.01$).

No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos de los monos infectados con distintas cepas.

Discusión

Son numerosos los informes sobre la presencia de inmunosupresión durante el curso de varias infecciones debidas a protozoarios (11). En ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* se observó que la respuesta a los eritrocitos de burro disminuyó (12). Otros demostraron una depresión significativa de la respuesta inmuno celular

Actividad Natural Killer (NK)

Se realizó un ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr, por triplicado, usando la línea celular K-562 de eritroleucemia humana como blanco. Se separaron los linfocitos por gradiente de Ficoll Hypaque y se obtuvieron células no adherentes, incubándolas en placas de Petri durante 45 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad para ser usadas como células efectoras (E). Resumiendo se marcaron 1 x 10⁶ células blanco (B) con 100 mCi de Na⁵¹CrO durante 1 hora, se lavaron e incubaron por otra hora para minimizar la liberación espontánea, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio RPMI-1640 a una concentración de 1x10⁵ células / ml. Se agregó un número creciente de células efectoras, suspendidas en 100 µl de medio, a iguales volúmenes de células blanco. La proporción de células E/B fue de 12,5:1 a 50:1. Después de 4 horas de incubación a 37 °C , 5% de CO₂ , 100% de humedad, se centrifugaron para extraer 100 µl de sobrenadante para el conteo en un contador Beckman Gamma 5000. Se determinó la liberación basal incubando las células blanco en medio RPMI, y la liberación máxima se obtuvo tratando con detergente las células blanco. El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Test cpm} - \text{cpm espontáneo}}{\text{cpm totales} - \text{cpm espontáneos}} \times 100$$

Resultados

Los resultados de la cuantificación de inmunoglobulinas se observan en las tablas 1 y 2; sólo las IgG mostraron una diferencia significativa entre los grupos (309,3 ± 96,3 UI/dl en los infectados vs. 242,0 ± 32,9 UI/dl en los controles, p<0.01).

La cuantificación de células T y B se observa en la tabla 3, donde los monos infectados poseen menor cantidad de linfocitos T que los controles (53,1 ± 8,7 % vs. 70,2 ± 10,4 %; p< 0.01).

La actividad citotóxica natural (NK) se muestra en la tabla 4, donde con una proporción efector/blanco = 50:1, en los infectados se observó una menor actividad (17,6 ± 9,6 % vs. 38,8 ± 7,2 %; p < 0.01).

No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos de los monos infectados con distintas cepas.

Discusión

Son numerosos los informes sobre la presencia de inmunosupresión durante el curso de varias infecciones debidas a protozoarios (11). En ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* se observó que la respuesta a los eritrocitos de burro disminuyó (12). Otros demostraron una depresión significativa de la respuesta inmuno celular

en ratones que sufrían de infección aguda (13). Cunningham y Kuhn (14,15) demostraron que la administración de suero de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* a ratones normales inducía un estado transitorio de inmunosupresión el cual podía mantenerse o reestablecerse al transferir cantidades adicionales de este suero. Otros autores demostraron inmunosupresión in vivo e *in vitro* durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas tanto en el hombre (16) como en animales (17-19). El mecanismo por el cual se induce y mantiene esta inmunosupresión no se ha determinado claramente, se ha sugerido la intervención de la interleukina 2 (20,21), la disminución de la expresión de receptores para la IL-2 (20,22) quizá mediada por proteínas secretadas por el parásito y otras sustancias (23, 24) y la disminución de la expresión de los genes *c-myc* y *c-fos* (25). También se ha observado que el *T. cruzi* afecta la expresión de CD4 y de CD8, y se demostró que el parásito induce la supresión de la expresión del receptor T, heterodímero esencial para la correcta presentación antigénica que disparará la respuesta inmune (26).

Por otro lado, la inmunosupresión en la enfermedad de Chagas crónica está sujeta a controversia ya que en el modelo ratón se demostró que la misma se produce en la fase aguda y en la crónica los parámetros celulares retornan a la normalidad (27). Breniere y col. (28) informaron que un bajo porcentaje de pacientes presentó una importante depresión de la producción de anticuerpos específicos humorales para *T. cruzi*. En un trabajo previo, efectuado en pacientes chagásicos crónicos, Eiguchi y col. (29) encontraron una disminución de la respuesta linfocitaria T a mitógenos y disminución de la actividad NK.

Plata (30) demostró que la diferenciación de linfocitos T citolíticos específicos para tumores se encontraba suprimida en ratones con infección crónica por *T. cruzi*, y Bottasso y col. (31) encontraron que la infección crónica experimental con *T. cruzi* disminuye la respuesta inmune celular a glóbulos rojos de carnero en las ratas.

En el presente trabajo se encontró una disminución en el porcentaje de linfocitos T y de la actividad citotóxica por células NK en los monos *Cebus apella* infectados experimentalmente con *T. cruzi*, en la fase considerada crónica de la infección. Los animales con parámetros celulares disminuidos mostraron títulos bajos de anticuerpos específicos (Fig. 2). Sin embargo el nivel de Ig G total (inespecífica) fue alto, como suele observarse en la mayoría de las enfermedades infecciosas crónicas.

Las observaciones expuestas sugieren la presencia de una inmunosupresión por supresores de células T en la infección experimental crónica con *T. cruzi* en los monos *Cebus apella*.

BIBLIOGRAFIA

- 1) WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991. "Chagas' disease". En: *Tropical Diseases Progress in Research*, 1989-1990, Tenth Program Report. WHO, Geneva, pag. 69-77.
- 2) MILEI, J. 1994. "Introducción". En: STORINO R. A. y MILEI, J. Eds. *Enfermedad de Chagas*. Doyma Argentina, Bs. As., pag. 1-7.
- 3) HOLBERT, R. D.; MAGIROS, E.; HIRSCH, C. P.; NUNENMACHER, S. J., 1995. "Chagas' disease, a case in south Mississippi". *J Miss State Med Assoc*, 36:1-7.
- 4) MILEI, J., 1994. "Patogenia". En: STORINO, R. A. y MILEI, J. Eds. *Enfermedad de Chagas*, Doyma Argentina, Bs. As., pág. 103-128.
- 5) FALASCA, C. A.; GRANA, D.; BÚCCOLO, J.; GILI, M.; MERLO, A.; ZOPPI, J.; MARESO, E., 1986. "Susceptibility of the *Cebus apella* monkey to different strains of *T. cruzi* after single or repeated inoculations", *PAHO Bull* 20: 117-137.
- 6) GILI, M.; GRANA, D.; MARESO, E.; GARCILASO, E.; FALASCA, C. A., 1987. "Electrocardiograma normal y patológico en el mono *Cebus apella*. Un modelo experimental de cardiopatía chagásica crónica". *Rev Arg Cardiol* 55: 168-176.
- 7) ROSNER, J. M.; BELLASAI, J.; SCHININI, A.; ROVIRA, T.; DE ARIAS, A.R.; FERRO, E. A.; FERREIRA, E.; VELÁZQUEZ, G.; MONZÓN, M. Y.; GALEANO, R.; FRESCO, M. A., 1988. "Cardiomyopathy in *Cebus apella* monkeys experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*", *Trop Med Parasit* 40: 24-31.
- 8) FALASCA, C. A.; GRANA, D. R.; GILI, M. M.; GOMEZ, E. E.; CHERET, J.P.; DEZI, R. E.; MARESO, E., 1994. "Alteraciones del sistema nervioso cardíaco y gastrointestinal en un modelo experimental de la enfermedad de Chagas crónica en primates". En: *La enfermedad de Chagas y el sistema nervioso*, O P S , Washington DC, publicación científica No 547, pág. 360-380.
- 9) EIGUCHI DE PALERMO, K.; CARBONETTO, C. H.; MALCHIODI, E.; MARGNI, R.A.; FALASCA, C. A., 1988. "Humoral and cellular parameters of the immune system of *Cebus apella* monkeys. Cross reactivity between monkey and human immunoglobulins", *Vet Immunol Immunopathol* 19: 341-349.
- 10) CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1980-1984. *Guide to the care and use of experimental animals*, 2 Vols., Ottawa.
- 11) MITCHEL, G. F., 1979. "Response to infection with metazoan and protozoan parasites in mice". *Adv Immunol* 28: -451-511.
- 12) CLINTON, B. A.; ORTIZ-ORTIZ, L.; GARCIA, W.; MARTINEZ, T.; CAPIN, R., 1975. "*Trypanosoma cruzi*: Early immune responses in infected mice". *Exp Parasitol* 37: 417-425.
- 13) REED, S. G.; LARSON, C. L.; SPEER, C. A., 1977. "Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease". *Parasitenk* 52: 11-17.
- 14) CUNNINGHAM, D. S.; KHUN, R. E., 1980. "*Trypanosoma cruzi*-induced

80 - INVESTIGACIONES

- suppressor substance. Y.-Cellular involvement and partial characterization". *J Immunol* 124 (5):2122-2129.
- 15) CUNNINGHAM, D. S.; KHUN, R. E., 1980. "Trypanosoma cruzi-induced suppressor substance. III.- Activation of suppressor cells". *J Parasitol* 66(6): 881-887.
- 16) VOLTARELLI, J. C.; DONADI, E. A.; FALCAO R. P., 1987. "Immunosuppression in human acute Chagas' disease". *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 81: 169-170.
- 17) TEIXEIRA, A. R. L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A., 1978. "Acquired cell-mediated immunosuppression in acute Chagas' disease". *J Clin. Invest* 62: 1132-1141.
- 18) KIERSZENBAUM, F., 1982. "Immunological deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells". *J Immunol* 129: 2202-2205.
- 19) MALECKAR, J. R.; KIERSZENBAUM, F., 1984. "Suppression of mouse lymphocyte responses to mitogens *in vitro* by *Trypanosoma cruzi*". *Int J Parasitol* 14: 45-51.
- 20) BELTZ, L. A.; KIERSZENBAUM, F., 1987. "Suppression of human lymphocyte responses by *Trypanosoma cruzi*". *Immunology* 60: 309-315.
- 21) KIERSZENBAUM, F.; CUNA, W. R.; BELTZ, L. A.; SZTEIN, M. B., 1989. "*Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components". *J Immunol* 143: 275-279.
- 22) SZTEIN, M. B.; KIERSZENBAUM, F., 1993. "Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infections". *Parasitology Today* 9: 424-428.
- 23) CHOROMANSKI, L.; KHUN, R. E., 1986. "Repeated antigenic stimulation overcomes immunosuppression in experimental Chagas' disease". *Immunology* 59: 289-294.
- 24) CHOROMANSKI, L.; KHUN, R. E., 1987. "Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice". *Infect Immun* 55: 403-408.
- 25) SOONG, L.; TARLETON, R. L., 1992. "Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2, *c-myc* and *c-fos* gene expression". *J Immunol* 149: 2095-2102.
- 26) SZTEIN, M. B.; KIERSZENBAUM, F., 1992. "Suppression by *Trypanosoma cruzi* of T-cell receptor expression by activated human lymphocytes". *Immunology* 77: 277-283.
- 27) LEITE-DE-MORAES, M. C.; HONTEBEYRIE-JOSKWICZ, M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. 1992. "Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection". *Immunology* 77: 95-98.
- 28) BRENIERE, S. F.; POCH, O.; SELAES, H.; TIBAYRENC, M.; LEMSRE, J. L.; ANTEZNA, G.; DESJEUX, P., 1984. "Specific humoral depression in chronic

patients infected by *Trypanosoma cruzi*". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 26 (5): 254-258.

29)EIGUCHI DE PALERMO, k.; CARLÍN, L. C.; NOVICK, G.; DI LONARDO, A. M., 1989. "Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con infección chagásica crónica". *Medicina, (Buenos Aires)*, 49: 465-466.

30)PLATA, F., 1985. "Enhancement of tumor growth correlates with suppression of the tumor-specific cytolytic T lymphocyte response in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*". *J Immunol* 134 (2): 1312-1319.

31)BOTTASSO, O. A.; REVELLI, S. S.; MORENO, H. S.; AMERIO, N.; MORINI, J. C., 1986. "Respuesta inmunitaria frente a glóbulos rojos de carnero en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Doyma de Inmunología* 5(4): 136-138.

TABLAS

Tabla 1.- Dosaje de inmunoglobulinas G, A y M (en UI/dl)

Inmunoglobulinas	Infectados	Controles	Significación
Ig G	309,3 ± 96,3	242,0 ± 32,9	p<0,01
Ig M	147,6 ± 34,3	124,0 ± 18,9	NS
Ig A	128,2 ± 41,3	123,5 ± 45,0	NS

Los resultados se expresan como media ± desvío estándar

Tabla 2.- Dosaje de Ig E por radioinmunoensayo (en KU/l)

Infectados	Controles	Significación
10,2 ± 5,7	7,3 ± 4,8	NS

Los resultados se expresan como media ± desvío estándar

82 - INVESTIGACIONES

Tabla 3.- Población linfocitaria (expresada en porcentaje)

Población celular	Infectados	Controles	Significación
T	53,1 ± 8,7	70,2 ± 10,4	p<0,01
B	16,2 ± 14,6	14,0 ± 5,0	NS

Los resultados se expresan como media ± desvío estándar

100% = 200 células mononucleares contadas

Tabla 4.- Actividad NK expresado como porcentaje de citotoxicidad (relación E/B=50:1)

Infectados	Controles	Significación
17,6 ± 9,6	38,8 ± 7,2	p<0,01

Los resultados se expresan como media ± desvío estándar.